

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平3-503317

⑬ 公表 平成3年(1991)7月25日

⑭ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

部門(区分) 6(1)

G 01 N 27/62
30/72
H 01 J 49/26

X 7529-2G
G 7621-2G
7247-5C

(全7頁)

⑮ 発明の名称 凍結溶液からの脱着による質量分析用試料の調製方法

⑯ 特 願 平2-503086

⑰ 出 願 平2(1990)1月12日

⑱ 翻訳文提出日 平2(1990)9月13日

⑲ 国際出願 PCT/US90/00229

⑳ 国際公開番号 WO90/08398

㉑ 国際公開日 平2(1990)7月26日

優先権主張 ㉒ 1989年1月17日 ㉓ 米国(US) ㉔ 298,649

㉕ 発 明 者 ベツカー, クリストファー・エ
イチ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 94025 メンロ・パーク、クロ
ーバー・レーン 106

㉖ 出 願 人 エス・アール・アイ・インター
ナショナル

アメリカ合衆国カリフォルニア州 94025-3493、メンロ・パー
ク、レイヴンズウッド・アヴェニュー 333

㉗ 代 理 人 弁理士 川原田 一穂

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特
許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域
特許)

請求の範囲

1. 次記の各工程を含むことを特徴とする質量分析用不揮発性分子試料の調製に有用な方法:

(a) 溶液を形成するように溶媒中に溶解させて、分析すべき1以上の型の分子を含む溶液を与える工程、

(b) 溶解した分子の該溶液を、凍結溶液を形成するように凍結する工程、および

(c) 該凍結溶液を、分析すべき分子を該凍結溶液の表面から脱着させるエネルギー源に暴露する工程。

2. 分析すべき1以上の分子を溶解して含む該溶液を与える該工程が、さらに、少なくとも約 500amu の質量を有する1以上の型の分子を溶解した溶液を与えることを含むことを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。

3. さらに、脱着した分子を質量分析領域に運ぶ工程を含むことを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

4. 分析すべき1以上の分子を含む溶液を与える該工程が、さらに、該分子を、該大きな分子を脱着するのに使用するエネルギーを強力に吸収する溶媒に溶解させる工程を含み、該溶媒が、該分子の、該凍結溶液の表面からの脱着を、該エネルギーの凍結溶液の表面より下での実質的吸収がなく、そのため溶液全体の加熱を阻止するように許容するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

5. 分析すべき該分子を溶媒に溶解させる該工程が、該分子の低分子量溶媒中への溶解を含むものであることを特徴とする請求の範囲第4項記載の方法。

6. 分析すべき該分子を低分子量溶媒に溶解させる該工程が、さらに該分子の約 100amu より小さい原子量を有する溶媒分子

より本質的になる溶媒中への溶解を含むものであることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。

7. 分析すべき該分子を低分子量溶媒に溶解させる該工程が、さらに該分子を、水、1-5 炭素原子の有機溶媒およびその混合物よりなる群から選ばれた溶媒への溶解を含むものであることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。

8. 溶解した分子の該溶液を凍結させる該工程が、さらに、10⁻³トルを越えない蒸気圧を有する凍結溶液を形成させることを含むものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

9. さらに、分析すべき該分子の該凍結溶液を真空室に運び、該凍結溶液を、該分子を該凍結溶液の表面から脱着させる間、10⁻³トルを越えない圧力に維持する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

10. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、該凍結溶液を、レーザー放射に暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

11. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、該凍結溶液を、イオン・ビーム・ボンバードメントに暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

12. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、該凍結溶液を、電子ビーム・ボンバードメントに暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

13. 分析すべき該分子の該凍結溶液を、該分子を脱着させる

特表平3-503317(2)

エネルギー源に暴露する該工程が、該凍結溶液を、高速原子ビーム・ボンバードメントに暴露するものであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

14. 該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、さらに該脱着した分子を、イオン化エネルギー源に暴露して、該脱着した分子を、該イオン化分子の質量分析の準備のためイオン化させる工程を含むことを特徴とする請求の範囲第2項記載の方法。

15. 次記工程を含むことを特徴とする、質量分析のための、大きな分子の処理に有用な方法：

(a) 少なくとも約 500amu の分子量を有する1以上の分析すべき分子を、続いて該分子を溶液から脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収することのできる低分子量溶媒に溶解させた溶液を与える工程、

(b) 溶解分子の該溶液を、凍結溶液を形成するように凍結させる工程、

(c) 該凍結溶液を、 10^{-5} トルより小さい蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する工程、および

(d) 該真空室内で、該凍結溶液を、該凍結溶液の表面から分析すべき分子を1-100分子層脱着させるのに充分なエネルギー源に暴露する工程。

16. 該凍結溶液を、該分子を脱着させるエネルギー源に暴露する該工程が、かような脱着分子のイオン化を結果しないものであり、且つ該方法が、該脱着分子を、イオン化分子の質量分析の準備のため該脱着分子をイオン化するイオン化エネルギー源に暴露する工程をも含むものであることを特徴とする請求の範囲第15項記載の方法。

強度を有するイオン化源に暴露する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第20項記載の方法。

22. 該凍結溶液を、 10^{-5} トルより小さい蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する該工程が、さらに、先ず該凍結溶液を該温度まで冷却し、次いで該冷却した凍結溶液を該真空室内に導入する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第20項記載の方法。

23. 該凍結溶液を、 10^{-5} トルより小さい蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する該工程が、さらに、先ず該冷却した凍結溶液を該真空室内に導入し、次いで該凍結溶液を該温度まで冷却する工程を含むことを特徴とする請求の範囲第20項記載の方法。

17. 該脱着分子をイオン化源に暴露して該脱着分子をイオン化する該工程が、さらに該脱着分子を光イオン化源に暴露する工程をも含むものであることを特徴とする請求の範囲第16項記載の方法。

18. 該分子を脱着させ、該脱着分子をイオン化する該工程が、継続的サイクルで遂行されることを特徴とする請求の範囲第16項記載の方法。

19. 該継続的脱着およびイオン工程が、該脱着エネルギー源および該イオン化源を継続的にパルス駆動することにより遂行されることを特徴とする請求の範囲第18項記載の方法。

20. 次記工程を含むことを特徴とする、質量分析のための、大きな分子の処理に有用な方法：

(a) 少なくとも約 500amu の分子量を有する1以上の分析すべき分子を、低分子量溶媒に溶解させて溶液とし、該溶液を与える工程、ここで該溶液は、続いて該分子を該溶液から脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収することのできるものである、

(b) 溶解分子の該溶液を、凍結溶液を形成するように凍結する工程、

(c) 該凍結溶液を、 10^{-5} トルを越えない蒸気圧を与えるのに充分低い温度で、真空室内に維持する工程、および

(d) 該真空室内で、該凍結溶液を、該凍結溶液の表面から分析すべき分子を1-100分子層脱着させるのに充分なレーザ放射、イオンビーム・ボンバードメント、電子ビーム・ボンバードメントおよび高速原子ボンバードメントよりなる群から選ばれたエネルギー源に暴露する工程。

21. さらに、該脱着分子を、該脱着分子のイオン化に充分な

明 細 書

凍結溶液からの脱着による質量分析用試料の調製方法

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、質量分析用試料の調製方法に係る。さらに特定の言え、本発明は、質量分析のための不揮発性または不安定な大きな分子の試料の調製方法を指向しており、そこでは、先ず大きな分子の溶液を凍結させ、凍結した分子を脱着させ、そして若し脱着分子が脱着手段によつて既にイオン化していない場合には、イオン化分子の質量分析ゾーンへの導入に先立つて脱着分子をイオン化するものである。この方法は、液体クロマトグラフィーと機械的にインタフェースすることが可能かつ容易である。

2. 先行技術の記載

液体クロマトグラフィー技術と組合せられた分子の質量分析において、液体は、しばしば蒸発し、蒸気中の分子は、質量分析用機器への導入に先立つてイオン化され、あるいは、溶液を蒸発させて得られた分子は、質量分析用機器のための粒子あるいは光子を脱着することによりイオン化される。しかしながら、分析用の大きな不揮発性または熱的に不安定な分子試料の調製のため慣用されている気化あるいは脱着技術は、溶媒と分子の不出来な気化あるいは脱着のみならず、かような大きな分子の制御不能な分裂あるいはクラスタリング（集合）を招くことがある。（不信頼性）

マクラッファティーら (McLafferty et al) に与えられた米国特許第 3,997,298 号は、液体クロマトグラフィー／質量分析装置を開示しているが、それは、カラムから分離した流出液

の部分(単/複数)を、充分な真空ポンピングによつて、化学イオン化質量分析計のイオン化室に直接導入するものである。

ブルーニーら(Brunce et al)に与えられた米国特許第4,259,572号は、質量分析用イオン化試料の調製方法を開示しているが、それは、液体クロマトグラフィー・カラムからの流出液を、動いているベルトコンベヤ上に置き、物質を残して溶液中の溶媒を蒸発させ、次いでベルトを、質量分析計に付随しているイオン化室の真空雰囲気中まで動かす、そこで物質がイオン、電子あるいはレーザーから来る光量子の形の高度に濃縮されたエネルギーに暴露される。特許権者は、開示された種々の具体例に共通の主要な概念は、コンベヤベルト上の試料の高度に集中されたエネルギーへの暴露を、常に非常に短い間隔、即ち数分の一秒以内に限ることを要求しており、エネルギーの集中によつて試料分子間の結合が、分子の化学分解を生じることなしに、あるいはそれに先立つて局部的に分離する様になされるようにしたと述べている。

スツーク(Stuke)の米国特許第4,686,366号は、パルス・レーザービームが質量分析計内で分析されるべき分子をイオン化するレーザー質量分析計を開示している。レーザー・パルスの持続時間は、分析される分子の分裂を避けるため、数ピコ秒に限られている。

これらの特許は、いずれも分子の不所望な分裂を回避することを意図した方法を記述しているが、現実の実施にあつてかような技術は部分的にしか成功していない、つまり分析される特定の分子(単または複数)にもよるが、ある分子は制御不能に分裂、あるいはクラスタし、そしてかような方法は予測不能で、それゆえ信頼できないと考えられている。

ボンバードされ、質量分析用のイオンを直接生み出す。FAB技術の主要な潜在的利点の一つは、表面への試料分子の連続的供給にある。しかしながら、表面への凝縮/偏析を避ける分子の型、表面における分裂分子の蓄積、溶媒分子からの干渉、ならびに結果として生じる混合試料中の相対量を定量する困難性が欠点として含まれる。

試料溶液に関する他の質量分析的方法には、質量分析に先立つ気化およびイオン化のため溶液を直接スプレーする方法が含まれる。かようなスプレー法の第一のもの、所謂サーモスプレー技術は、ベスタル(M.L.Vestal)によりサイエンス(Science) Vol. 226, (1984), pp. 275-281に掲載された「高性能液体クロマトグラフィー・質量分析」(High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)と題する論文に記述され、そこで、キャピラリーに充分な熱を加えて、液体がキャピラリーを通過する際、液体の制御された部分的な気化が生じるようにした、運行粒子あるいは滴を伴う超音波ジェット生成と定義されている。

スプレー法の第二のもの、所謂エレクトロスプレー法は、ワングら(Wong et al)によりジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー(Journal of Physical Chemistry) Vol. 92 (1988), pp. 546-550に掲載された「ポリエチレン・グリコールのエレクトロスプレー・イオン化におけるマルチプル・チャージング」(Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly(ethylene glycols))と題する論文に記述され、そこで、著者は、溶液を、接地電位のメタライズしたキャピラリー管に対し高い電圧に保たれた金属の注射針を通じてエレクトロスプレー室に導入する方法であると述べている。針先端の高い電場

ベッカーら(Becker et al)の米国特許第4,739,073号は、本発明者らによつてなされ本発明の譲受人に譲渡され、かつここに相互参照がなされているが、イオンビーム、電子ビームあるいはレーザービームのようなプローブ・ビームが、分析される表面に対して向けられ、物質の試料がその表面から取り除かれるようにした試料の質量分析方法および装置を開示している。次いで、非同調の高強度レーザービームのような電磁放射のビームが、その表面の上の空間領域に向けられ、その放射ビームの中で、取り除かれた表面試料の非共鳴的な光イオン化を生じさせる。イオン化された試料は次いで、質量分析に供される。

過去約10年にわたつて、ブルーニーらの特許で述べられたような試料の粒子または光量子のボンバードを使用する大きな不揮発性または熱的に不安定な分子の質量分析を記述した文献の数多くの例が現れて来た。この開発を回顧した一論文は、ブッシュおよびクックス(K.L.Busch and R.G.Cooks)による「大きな壊れ易い不揮発性分子の質量分析」(Mass Spectrometry of Large, Fragile Molecules)と題し、サイエンス(Science) Vol. 218, (1982), pp. 247-254に掲載されたものである。

この論文に記述された方法の一つは、高速原子ボンバードメント(FAB)と呼ばれる。このFAB法は、ライネハート(K.L.Rhinehart, Jr.)によりサイエンス(Science, Vol. 218, (1982), pp. 254-260)に掲載された「高速原子ボンバードメント質量分析」(Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry)と題する論文で、より詳しく回顧されている。FAB法では、試料は低揮発性の、普通グリセロールである液体中の溶媒とされる。この溶媒は、次いでキロ電子ボルトのエネルギーの原子により

が、出現する液体の表面を荷電し、それを荷電滴の微細なスプレーに分散させる。その滴がキャピラリー管に向かつて進むとき、溶媒は、荷電した溶質を残して蒸発し、溶質は次いでキャピラリー管を通じて質量分析計まで進む。

しかしながら、上記の場合の各々において、質量分析のための生体分子のような大きな不揮発性分子の調製は、分子を、分子のイオン化に先立ちあるいはイオン化中に気化させようと試みながらも、依然として大きな分子の非特徴的分裂またはクラスタリング、あるいは大きな分子のその他には特徴付けられない、または信頼出来ない単離の危険を招くものである。

発明の概要

それゆえ、本発明の一目的は、分子の不所望な分裂の危険を最小限にする手法での、1以上の型の大きな分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のこの他の目的は、分子の非特定のな分裂、あるいは分子の不明瞭で信頼不能な同定を招く危険を最小限にする手法での、大きな分子の質量分析用純粋または混合試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに別の目的は、分析すべき大きな分子を溶媒中に、あるいは既に存在している適当な溶液を使用して溶解し、続いて得られた溶液を凍結させ、次いで、脱着工程中の分子の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子を脱着させることによる、後続のイオン化のために信頼し得る一様な手法での、1以上の型の大きな分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、分析すべき大きな分子を溶媒中に溶解し、得られた溶液を約10⁻³トルを越えない蒸気圧を与

える温度で凍結させ、次いで、脱着工程中の分子の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子をエネルギー源を使用して脱着させることによる、1以上の大きな分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに別の目的は、分析すべき大きな分子を溶媒中に溶解し、得られた溶液を凍結させ、次いで、凍結溶液を約 10^{-5} トルを越えない蒸気圧を与える温度まで冷却し、次いで、脱着工程中の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子をレーザー放射、イオンビーム・ボンバードメントあるいは高速原子ビーム・ボンバードメントのようなエネルギー源を使用して脱着させることによる、1以上の大きな分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、分析すべき大きな分子を、この大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収する溶媒中に溶解し、得られた溶液を約 10^{-5} トルを越えない蒸気圧を与える温度で凍結させ、次いで、脱着工程中の分子の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結溶液の表面から大きな分子をレーザー放射、電子ビーム・ボンバードメント、イオンビーム・ボンバードメントあるいは高速原子ビーム・ボンバードメントのようなエネルギー源を使用して脱着させることによる、1以上の大きな分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のさらに別の目的は、分析すべき大きな分子を、この大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギーを強力に吸収する溶媒中に溶解し、得られた溶液を凍結させ、次いで、凍結溶液を約 10^{-5} トルを越えない蒸気圧を与える温度まで冷却し、次いで、脱着工程中の崩壊の危険を最小限にしながら、凍結試

料の表面から大きな分子をレーザー放射、イオンビーム・ボンバードメントあるいは高速原子ビーム・ボンバードメントのようなエネルギー源を使用して脱着させ、次いで、脱着分子をイオン化エネルギー源に暴露して、イオン化分子の質量分析の準備をするよう、脱着分子をイオン化することによる、1以上の大きな分子の質量分析用試料の調製方法を提供することにある。

本発明のこれらおよびその他の目的は、以下の説明および添付図面から明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明方法を概括的に描いたフロー・シート、

第2図は、本発明方法の実施に関して有用な装置を説明する一部を切り開いた斜視図、また

第3図は、凍結溶液を大きな分子の真空室内での脱着を許容するのに十分な低温に維持するのに使用される冷却手段を示す第2図の一部の分解側断面図である。

発明の詳細な説明

本発明によれば、大きな分子は、最初に、その後かような大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギーを吸収することの出来る低分子量の溶媒中の大きな分子の溶液とし、次いで得られた溶液を凍結させ、次いで、凍結溶液をレーザー、電子ビーム、イオンビームあるいは高速原子ビームのような脱着エネルギー源に暴露して、かような大きな分子を凍結溶液の表面から脱着させることにより、その大きな分子の不所望な分裂の危険を最小限にしながら、質量分析で分析することが出来る。

若し、この大きな分子を脱着させるのに使用するエネルギー源が同時に分子をイオン化しないならば、脱着分子を、別の、例えばレーザービームの光イオン化源のようなエネルギー源に暴

露して、質量分析装置での分子の分析に先立つて脱着分子をイオン化させてもよい。いずれの場合でも、脱着工程中の分裂は避けられるか最小限に食い止められ、非特定の、あるいは制御不能な分裂は起こらないようになる。

若し、分子(単または複数)に官能基があり、それが存在すれば、そこで開裂が起こる特定の点での開裂による、そうした官能基の分析を通じての分子(単または複数)の同定のための追加的手段を提供するため、大きな分子あるいは分子の混合物を分裂させることが望ましいならば、かような分裂崩壊は、かような分裂に使用されるエネルギーが非特定の分裂を避けるべく、および/または、その中で分子の官能基(複数)が隣接していると言う洞察のため分裂の程度をゆっくり変化させるべく注意深く制御することが出来る別の工程でしてもよい。かような後続の別の分裂工程は、当技術に熟達した者に良く知られており、本発明の一部を成すものではない。

凍結溶液を形成し、次いでこの溶液の表面から分子を局部的にのみ脱着させること、即ち、好ましくは、分子の質量にもよるが一時に約1から100層の分子、即ち一時に約300オングストロームの深さまで脱着させることにより、そうでなければ、分子の内いくらかのものの分裂または反応を招く大量の気化エネルギーに対する、分子の暴露を最小限にしながら、大きな分子の制御された気化を与えることが可能となる。

「大きな分子」なる用語の使用により、それに、バイオモレキュール、即ち少なくとも500原子質量単位(amu)の分子量を有する生命化学分子、のような分子を意味させる。脱着工程中的かような大きな分子の分裂の危険を最小限にしながら、本発明方法で有利に処理可能なバイオモレキュールあるいは生命

化学分子のような大きな分子の型の例には、ペプチドおよび多糖類が含まれる。

この大きな分子は、好ましくは、脱着エネルギー源からのエネルギーを強力に吸収する低分子量溶媒、例えばレーザーの波長でのレーザー光を強力に吸収する低分子量の溶媒中に溶解させられ、凍結試料の大部分には脱着エネルギーは僅かにのみ浸透して、上で議論したように凍結溶液から、分子の表面の頂上層あるいは頂上のいくらかが、即ち表面の約1—100層に限って除去されることが容易なようにする。

「低分子量の溶媒」とは、約100 amuより小さい原子量を有する分子より本質的に成る1以上の化合物を含む溶媒を意味する。本発明の実施に使用可能な溶媒の例には、水、アルコール、アルデヒド、ケトンおよび有機酸のような1—5の炭素の有機溶媒およびかような有機溶媒のハロゲン化誘導体が含まれる。かような溶媒を使用する理由には、容易な溶解、より豊富な脱着溶媒分子の流れにおいて、より大きな溶媒和した分子を運搬すること、より軽く、より速く運動する溶媒分子との多くの衝突による大きな分子の内部的な自由度を冷却すること、衝突の連続間における急速なエネルギー消散、および溶媒と溶質分子との間の質量の大きな差による質量干渉の回避が含まれる。

好ましい実施例に従った、脱着源からのエネルギーの溶媒による吸収の度合いに関して、「強力に吸収する」なる用語は、脱着源、とりわけ脱着エネルギー源がレーザー源であるとき、それからのエネルギーを十分に吸収し、約70—100%のエネルギーを凍結溶液の表面の約1—10マイクロメートル以内で吸収するような溶媒を意味する。これは、脱着工程において、若し

特表平3-503317(5)

、凍結溶液の質量全体が刺激されているとすれば、より容易に起き得る大きな分子の分裂を阻止しながら、大きな分子の所望の制御された脱着を与える。それにより、試料の不必要な加熱が避けられ、そして脱着を分子層の極く限られた範囲に限定することにより、脱着を、より制御され一様なもの、即ち溶質分子とは無関係なものとする事ができる。

溶媒中の大きな分子の濃度は、十分に低くして、溶質分子の重要な相互作用を避け、刺激ビーム—溶媒の相互作用が脱着プロセス全体を支配することを許容し、このプロセスが信頼でき一様であるよう、即ち溶質分子の性質に強くは依存しないようにすべきである。したがって、溶液の濃度は、 10^{-3} 溶媒分子につき約 1 を越えない溶質分子のものとするべきであり、典型的には、濃度は、 10^{-4} 溶媒分子につき約 1 を越えない溶質分子のものとなる。

本発明にしたがつて低分子量の溶媒に溶けた大きな分子の溶液を作った後、溶液は、そこから分析すべき大きな分子が脱着しうな固体物質を与えるために凍結される。

分析すべき凍結溶液試料を作るために凍結される溶液の量は、大きい必要はなく、より大きい量も許容しうるが、一滴、例えば最小約 1 μ l の小量で構成されてよい。

続く脱着工程自体のために、溶液の温度を、液体溶液を固相に変えるのに充分なように低くすることだけは必要である。しかしながら、大きな分子は脱着の後、脱着が真空室で起こることを指令する高真空の質量分析装置に運ばなければならない。

この点から、凍結溶液を、脱着に先立つて、そこでの蒸気圧が凍結溶液を脱着工程前に真空室に入れることを許容するような充分低い温度まで冷却することが必要である。好ましくは、

凍結溶液は、そこでの凍結溶液の蒸気圧が、約 10^{-10} トルを越えない温度、さらに好ましくは、約 10^{-11} トルを越えない温度まで冷却すべきである。

この冷却は、凍結溶液を脱着工程が生じる真空室に入れる前に行なつてよく、効果的である。しかしながら、凍結溶液を真空室に入れた後、その温度をさらに冷却することも本発明の範囲内である。

いずれの場合でも、凍結溶液を真空室の所望の低い圧力を維持するのに充分な低い温度に維持するため、ならびに溶媒の優先的な蒸発に由来する試料の頂部における一様でない濃度分布を避けるため、真空室内に冷却手段を設けることが必要である。これは、装置の説明で後述するように、その上に凍結溶液が乗り、それを通じて外部の冷却源からの冷媒が循環する真空室内のコールド・プレートを含むものであつてよい。

第2図および第3図を参照すると、本発明の実施に使用するのに適した装置が概括的に示されている。この装置のいくつかの局面は、そうしたものの詳細構成に関して、相互参照した上述の、ベッカーらの米国特許第 4,733,073 号に図解し記述された装置とほぼ同様である。

第2図に示すように、真空室2内には、試料保持具10が設けられており、その上に凍結溶液の試料8が置かれあるいは乗せられている。真空室2内には、さらに慣用の真空ポンプ手段(図示せず)に導くポート6を含む室2のための排気手段が設けられている。

第3図でより詳細に示すように、試料保持具10は、さらに試料8を、少なくとも 10^{-10} トルを越えない温度、好ましくは、約 10^{-11} トルを越えない所望の低い蒸気圧を維持するのに充

分な冷却温度に維持する手段12を含むものであつてよい。冷却手段12は、それを通じて外部の冷却源22からの冷媒が流入管18および流出管20を経由し循環する1以上の通路16を有する金属バック・プレート14を含むものであつてよい。

脱着エネルギー源手段30は、真空室2の外部あるいは内部(図示のように)のいずれに置かれてもよいが、脱着エネルギー源31および指向手段32を含むものである。源31には、電子銃、イオン銃あるいはレーザーが含まれてよい。キロ電子ボルト・エネルギーの中性原子あるいは分子もまた、脱着エネルギー源31として使用することができる。かようなエネルギー源の構造は、慣用のもので、当技術に熟達した者に、例えば電子ビーム脱着、イオン・ビーム・スパッタリングあるいはレーザー・マイクロプローブ技術からよく知られているものである。

脱着エネルギー源31と結合してエネルギー源31からのエネルギー・ビームを試料8上に指向する指向手段32は、荷電粒子ビームに対する静電および/または電磁集束および偏向手段、あるいは試料8の表面上にレーザー光ビームを指向・集束させる鏡およびレンズを含むものであつてよい。

直接イオン化、即ち脱着と同時のイオン化、が適しない場合について、真空室2内の脱着分子をイオン化するため、イオン化手段40もまた備えられている。イオン化手段40は、イオン化ビームの位置を決定するのに使用する高強度光源42、集束レンズ系44およびアイリス絞り46を含むものであつてよい。イオン化ビーム源42は、典型的には、高強度レーザーあるいは分析すべき脱着した大きな分子の効果的な光イオン化を十分に達成するために共に結合したレーザーと光学材料および部品との組合せによつて装備される。

第2図に示す実施例において、真空室2には、そこを通じて放射のイオン化ビームが投射される直径方向で対向している窓52および54が備えられていてよい。この実施例では、イオン化ビーム源42が、真空室2の外側に設けられ、イオン化ビームは窓52を通じて分析すべき試料8の表面に近接したイオン化領域に向けられる。イオン化ビームは、続いて窓54を通じて位置決定アイリス絞り48を過ぎ、イオン化ビーム源42の光強度を監視する役割の検出器50に受け止められる。

イオン化ビーム源42は、非共鳴マルチ光子イオン化について、 10^{-4} から 10^{-12} W/cm² の範囲のパワー密度を有するレーザーを含むものであつてよい。このレーザーは、タイム・オブ・フライト質量分析のために、約 10^{-10} 秒またはそれ以下の周期のパルスで、パルス駆動されるものであつてもよい。非共鳴シングル光子イオン化に対しては、より小さい光強度が要求される；しかし一般的に、パルス当たり少なくとも約 10^{11} 個の光子を有するパルスが効果的なイオン化のために必要とされる。

脱着時にイオン化しない脱着分子のイオン化は、真空紫外線(VUV)放射を伴うシングル光子イオン化を使用して行つてもよく、これは大きな分子に対する柔軟な方法で、非選択的であり、また極めて効果的したがって高感度に行なうことができる。非直線的に作られたコヒーレントな光ビーム、例えば、118 ナノメートルで約10.5 電子ボルトのエネルギーレベルを有するのは、シングル光子 VUV 光イオン化源として便利である。シングル光子ビーム源の強度は、マルチプル・イオン化が起こらないように制御しなければならない。光イオン化・ビーム源の強度は、それゆえ好ましくは吸収確率が、約10% を越えな

いように制御される。

マルチプル光子は、若し特定の分析すべき大きな分子のイオン化ポテンシャルが、より短い波長即ち約 130 ナノメートルより短い波長を使用しない限りシングル光子エネルギーより高い時にも脱着分子をイオン化するのに使用してもよい。しかしながら、マルチプル光子イオン化を使用した時、強度の制御はとりわけて重要となる、と言うのは、分子の制御不能な崩壊が生じる暴走(runaway) 吸収条件を経験することがあるからである。一般的に、約 10^8 W/cm² を越えないレーザー・パワー密度が適当である。

しかしながら、シングルあるいはマルチプル光子イオン化のいずれを使うかで、分析すべき大きな分子のイオン化に必要なとされるエネルギーを越えるある追加的なエネルギーの吸収が、大きな分子に付着しているすべての溶媒分子を振り払うのに使われてよい振動エネルギーに変換されることがあり、また追加的に吸収されたエネルギーが、単に電子除去における動力学的エネルギーとして消散すると言うことに注意しなければならない。

真空室2はさらに、第2図で一般的に60で示す本発明による凍結溶液から脱着し、イオン化した大きな分子の質量分析のための質量分析手段を含んで(あるいは、それと結合して)いてもよい。この質量分析手段60の代替的な型は、ここに相互参照した上述の、ベッカーらの米国特許第 4,733,073 号で、より詳細に議論されている。

かように、本発明は、凍結溶液からの脱着が、脱着工程中、大きな分子の分裂あるいはクラスタリングを最小限に止める手法での質量分析のための大きな分子の処理方法を提供する。イ

オン化は、脱着される分子にもよるが、脱着工程と一緒に رفتてもよく、また別のイオン化工程で行つてもよい。或る特徴的な崩壊が、質量分析のために望ましいときがあるので、本発明のシステムは、制御された手法での意図的崩壊工程(例えば的レーザー放射あるいは衝突活性化)の追加を容易にするのに役立つようにされている。このようにして、脱着、イオン化および、必要なら崩壊の3プロセスは、最大の効果のために最大限に断結合(decouple)されてよい。

質量分析により分析すべき大きな分子量の化合物の溶液を、大きな分子を低分子量の溶媒中に溶解して形成する。

この溶液を、凍結させ、それを蒸気圧が 10^{-8} トルより小さい温度まで冷却する。

真空室中で、脱着エネルギー源を使用し、その凍結溶液から分子の表面層を脱着させる。

その脱着した分子を、脱着した分子を崩壊させないレベルのエネルギーで光イオン化する。

脱着し且つイオン化した分子を、質量分析装置中で、分析する。

FIG. 1

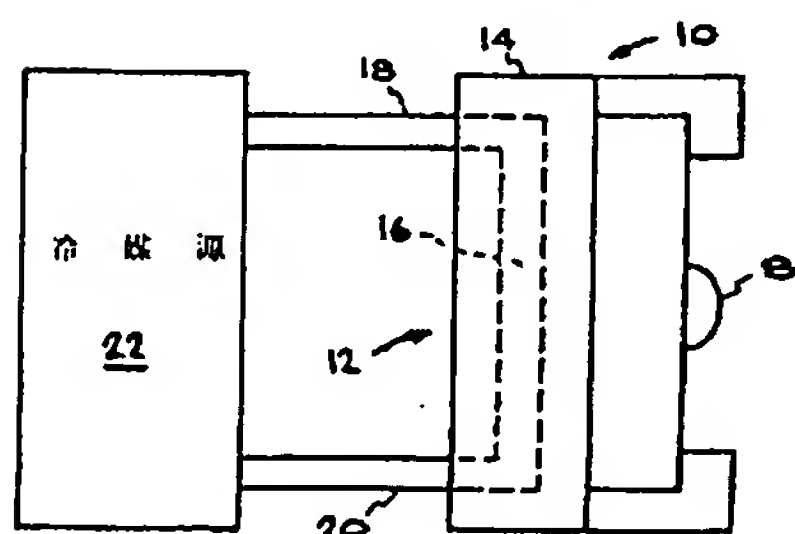


FIG. 3

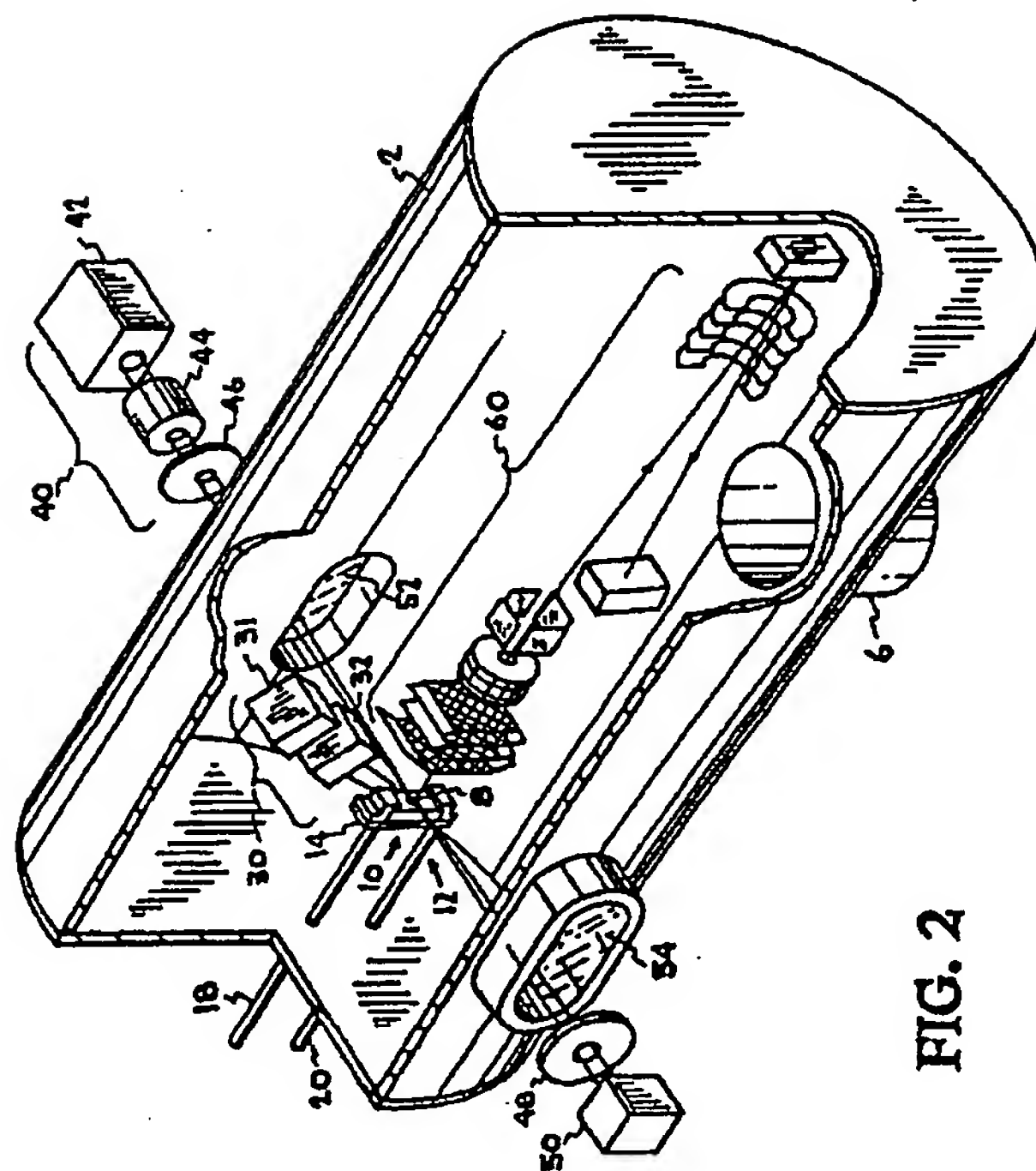


FIG. 2

国际调查报告

International Application No. PCT/US 90/00229

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER in view of classification symbols only, indicate all	
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC	
IPC ³ , H 01 J 49/04, G 01 N 30/84	
II. FIELDS SEARCHED	
Classification System I	Classification System
IPC ³	H 01 J, G 01 N, H 01 L
Documents searched other than those on Documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category ¹	Character of Document, ² and indication, where appropriate, of the relevant passages ³
A	WO, A, 85/02907 (SRI INTERNATIONAL) 4 July 1985 see figure 1; page 6, lines 8-20; page 9, line 35 - page 10, line 2; page 11, lines 17-34; page 15, lines 18-24 (cited in the application) --
A	EP, A, 0175467 (NICOLET INSTRUMENT CORP.) 26 March 1986 see figure 1; abstract; page 9, lines 15-26; page 10, lines 21-27; page 11, lines 8-12 --
A	US, A, 4663944 (M.T. BERNIUS et al.) 12 May 1987 see figure 3; abstract --
¹ Search categories of cited documents: ² ³ ¹ "A" documents falling the priority date of the art which is not ² considered to be of particular interest ³ "B" documents not published on or after the international ⁴ filing date ⁵ "C" documents which, after their date of priority claim(s) or ⁶ which is used to establish the publication date of another ⁷ document of some special reason (see footnote) ⁸ "D" documents covering to an art document, not publication or ⁹ other means ¹⁰ "E" documents published prior to the international filing date but ¹¹ not that the priority date is claimed ¹² "F" documents published after the international filing date ¹³ or priority date and not in conflict with the invention but ¹⁴ being in the same art or in the same field of technology ¹⁵ "G" documents of particular interest; the limited European ¹⁶ search is considered to be of interest to the art ¹⁷ "H" documents of particular interest; the limited European ¹⁸ search is considered to be of interest to the art ¹⁹ "I" documents of particular interest; the limited European ²⁰ search is considered to be of interest to the art ²¹ "J" documents of particular interest; the limited European ²² search is considered to be of interest to the art ²³ "K" documents of particular interest; the limited European ²⁴ search is considered to be of interest to the art ²⁵ "L" documents of particular interest; the limited European ²⁶ search is considered to be of interest to the art ²⁷ "M" documents of particular interest; the limited European ²⁸ search is considered to be of interest to the art ²⁹ "N" documents of particular interest; the limited European ³⁰ search is considered to be of interest to the art ³¹ "O" documents of particular interest; the limited European ³² search is considered to be of interest to the art ³³ "P" documents of particular interest; the limited European ³⁴ search is considered to be of interest to the art ³⁵ "Q" documents of particular interest; the limited European ³⁶ search is considered to be of interest to the art ³⁷ "R" documents of particular interest; the limited European ³⁸ search is considered to be of interest to the art ³⁹ "S" documents of particular interest; the limited European ⁴⁰ search is considered to be of interest to the art ⁴¹ "T" documents of particular interest; the limited European ⁴² search is considered to be of interest to the art ⁴³ "U" documents of particular interest; the limited European ⁴⁴ search is considered to be of interest to the art ⁴⁵ "V" documents of particular interest; the limited European ⁴⁶ search is considered to be of interest to the art ⁴⁷ "W" documents of particular interest; the limited European ⁴⁸ search is considered to be of interest to the art ⁴⁹ "X" documents of particular interest; the limited European ⁵⁰ search is considered to be of interest to the art ⁵¹ "Y" documents of particular interest; the limited European ⁵² search is considered to be of interest to the art ⁵³ "Z" documents of particular interest; the limited European ⁵⁴ search is considered to be of interest to the art ⁵⁵ "AA" documents of particular interest; the limited European ⁵⁶ search is considered to be of interest to the art ⁵⁷ "AB" documents of particular interest; the limited European ⁵⁸ search is considered to be of interest to the art ⁵⁹ "AC" documents of particular interest; the limited European ⁶⁰ search is considered to be of interest to the art ⁶¹ "AD" documents of particular interest; the limited European ⁶² search is considered to be of interest to the art ⁶³ "AE" documents of particular interest; the limited European ⁶⁴ search is considered to be of interest to the art ⁶⁵ "AF" documents of particular interest; the limited European ⁶⁶ search is considered to be of interest to the art ⁶⁷ "AG" documents of particular interest; the limited European ⁶⁸ search is considered to be of interest to the art ⁶⁹ "AH" documents of particular interest; the limited European ⁷⁰ search is considered to be of interest to the art ⁷¹ "AI" documents of particular interest; the limited European ⁷² search is considered to be of interest to the art ⁷³ "AJ" documents of particular interest; the limited European ⁷⁴ search is considered to be of interest to the art ⁷⁵ "AK" documents of particular interest; the limited European ⁷⁶ search is considered to be of interest to the art ⁷⁷ "AL" documents of particular interest; the limited European ⁷⁸ search is considered to be of interest to the art ⁷⁹ "AM" documents of particular interest; the limited European ⁸⁰ search is considered to be of interest to the art ⁸¹ "AN" documents of particular interest; the limited European ⁸² search is considered to be of interest to the art ⁸³ "AO" documents of particular interest; the limited European ⁸⁴ search is considered to be of interest to the art ⁸⁵ "AP" documents of particular interest; the limited European ⁸⁶ search is considered to be of interest to the art ⁸⁷ "AQ" documents of particular interest; the limited European ⁸⁸ search is considered to be of interest to the art ⁸⁹ "AR" documents of particular interest; the limited European ⁹⁰ search is considered to be of interest to the art ⁹¹ "AS" documents of particular interest; the limited European ⁹² search is considered to be of interest to the art ⁹³ "AT" documents of particular interest; the limited European ⁹⁴ search is considered to be of interest to the art ⁹⁵ "AU" documents of particular interest; the limited European ⁹⁶ search is considered to be of interest to the art ⁹⁷ "AV" documents of particular interest; the limited European ⁹⁸ search is considered to be of interest to the art ⁹⁹ "AW" documents of particular interest; the limited European ¹⁰⁰ search is considered to be of interest to the art 	
IV. CERTIFICATION	
One of the Attestation of the International Search	Date of Making of the International Search Report
10th May 1990	26.06.90
International Searching Authority	Signature of Authorised Official
EUROPEAN PATENT OFFICE	M. P. 27 M. PEIS

Form PCT/ISA/210 (revised March 1989)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Category ¹	Character of Document, ² and indication, where appropriate, of the relevant passages ³
A	Science, vol. 218, 15 October 1982, AAAS, K.I. Busch et al.: "Mass spectrometry of large, fragile, and involatile molecules", see pages 247-254 (cited in the application) --
A	Mesures Régulation Automatismes, vol. 48, no. 2, 21 February 1983, (Paris, FR), M.O. Mizier: "Le récent couplage CPL/SM doit reculer les limites de l'analyse", see pages 51-61 -----

Form PCT/ISA/210 (revised March 1989)

国际调查报告

US 9000229
SA 34354

This annex lists the source family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as certified in the European Patent Office EDP file on 11/06/90.
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family members ²	Publication date
WO-A- 8502907	04-07-85	AU-B- 570531	17-03-88
		AU-A- 3744785	12-07-85
		CA-A- 1220879	21-04-87
		DE-T- 3490395	28-11-85
		EP-A,B 0167561	15-01-86
		GB-A,B 2160014	11-12-85
		JP-T- 61500866	01-05-86
		NL-T- 8420305	01-11-85
		SE-B- 452676	07-12-87
		SE-A- 8503901	21-08-85
		US-A- 4733073	22-03-88
EP-A- 0175467	26-03-86	US-A- 4594506	10-05-88
		JP-A- 61071353	12-04-86
US-A- 4663944	12-05-87	None	

For more details about this annex, see Official Journal of the European Patent Office, No. 13/83